

Optical arrangement for illuminating objects and double - confocal scanning microscope

Best Available Copy

Patent number: DE10046410
Publication date: 2002-03-28
Inventor: BEWERSDORF JOERG (DE); GUGEL HILMAR (DE); HOFFMANN JUERGEN (DE)
Applicant: LEICA MICROSYSTEMS (DE)
Classification:
 - **International:** G02B21/00; G02B21/08; G02B26/06; G02B21/00; G02B21/06; G02B26/00; (IPC1-7): G02B21/06; G02B21/18
 - **European:** G02B21/00M4A3; G02B21/00M4A7U; G02B21/08D; G02B26/06
Application number: DE20001046410 20000918
Priority number(s): DE20001046410 20000918

Also published as:

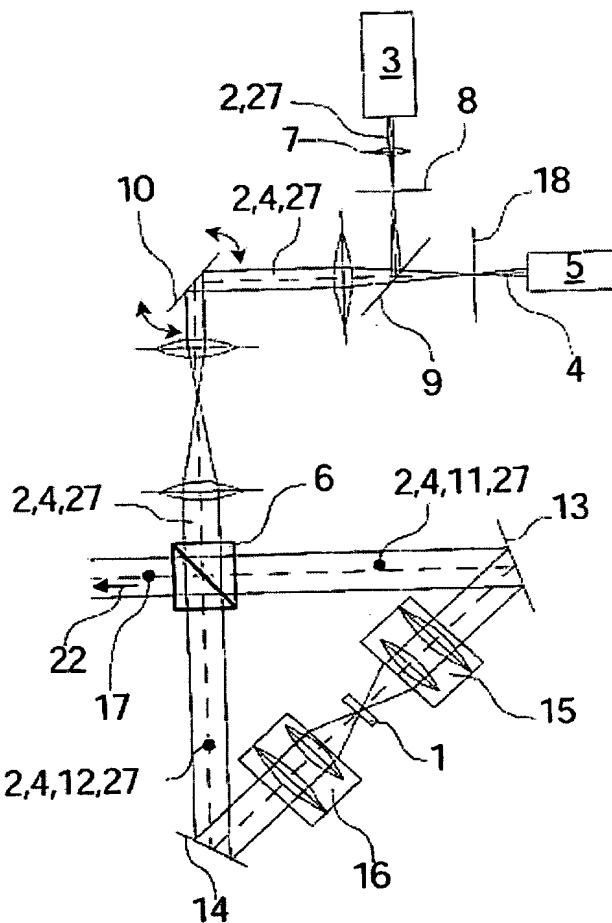
 EP1189090 (A2)
 US6570705 (B2)
 US2002034002 (A1)
 JP2002107634 (A)
 EP1189090 (A3)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for DE10046410

Abstract of corresponding document: **US2002034002**

The present invention relates to an optical arrangement for illuminating objects (1), in particular fluorescent objects, preferably in conjunction with a confocal or a double-confocal scanning microscope, having an illuminating beam path (2) of a light source (3), a detection beam path (4) of a detector (5), and a component (6) which unifies the detection beam path (4). For the purpose of at least largely loss-free union of the light coming from the object (1) into a propagation direction (19), the optical arrangement according to the invention is characterized in that with reference to the beam cross section active for the detector, light of the first and second partial detection beam can be united at least largely in an overlapping fashion into one propagation direction (19) at the component (6) thereby providing an unified the detection beam path (4).





⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 46 410 A 1**

⑤) Int. Cl.⁷:
G 02 B 21/06
G 02 B 21/18

② Aktenzeichen: 100 46 410.6
② Anmeldetag: 18. 9. 2000
④ Offenlegungstag: 28. 3. 2002

⑦1 Anmelder:
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 68165
Mannheim, DE

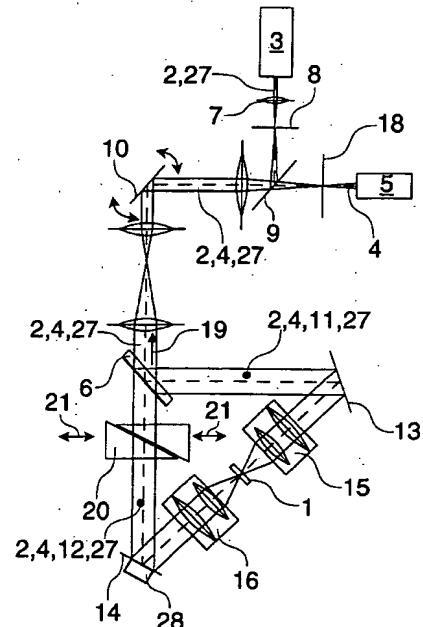
⑦4 Vertreter:
Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

② Erfinder:
Bewersdorf, Jörg, 69121 Heidelberg, DE; Gugel, Hilmar, 69221 Dossenheim, DE; Hoffmann, Jürgen, 65191 Wiesbaden, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

54 Optische Anordnung zum Beleuchten von Objekten

57 Die vorliegende Erfindung betrifft eine optische Anordnung zum Beleuchten von Objekten (1), insbesondere von Fluoreszenzobjekten, vorzugsweise in Verbindung mit einem konfokalen oder einem doppelkonfokalen Rastermikroskop, mit einem Beleuchtungsstrahlengang (2) einer Lichtquelle (3), einem Detektionsstrahlengang (4) eines Detektors (5) und einem den Detektionsstrahlengang (4) vereinigenden Bauteil (6). Zur zumindest weitgehend verlustfreien Vereinigung des vom Objekt (1) kommenden Lichts in eine Ausbreitungsrichtung (19) ist die erfindungsgemäße optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, dass das vom Objekt (1) kommende Licht an dem den Detektionsstrahlengang (4) vereinigenden Bauteil (6) bezüglich des für den Detektor wirksamen Strahlquerschnitts zumindest weitgehend überlappend in eine Ausbreitungsrichtung (19) vereinigbar ist, wobei Mittel (20) zur Beeinflussung der Phase des vom Objekt (1) kommenden Lichts vorgesehen sind, die zumindest in einem Teilstrahlengang (11, 12) des Detektionsstrahlengangs (4) angeordnet sind.



DE 100 46 410 A 1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine optische Anordnung zum Beleuchten von Objekten, insbesondere von Fluoreszenzobjekten, vorzugsweise in Verbindung mit einem konfokalen oder einem doppelkonfokalen Rastermikroskop, mit einem Beleuchtungsstrahlengang einer Lichtquelle, einem Detektionsstrahlengang eines Detektors und einem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil.

[0002] Vorrichtungen der gattungsbildenden Art sind in der Praxis bekannt und werden beispielsweise in der EP 0 491 289 oder der US 5 671 085 verwendet. Aus beiden Druckschriften sind Mikroskopanordnungen bekannt, bei denen ein Objekt mit zwei einander entgegengesetzt angeordneten Mikroskopobjektiven beleuchtet bzw. detektiert wird. Zur Beleuchtung wird der Beleuchtungsstrahlengang in zwei Teilstrahlengänge aufgespalten; so dass das Objekt von einander entgegengesetzt verlaufenden Lichtstrahlen gleichzeitig beleuchtet werden kann. Das Licht der beiden Beleuchtungsstrahlengänge interferiert im Objektbereich, wodurch das Objekt mit einem verbesserten Auflösungsvermögen beleuchtet werden kann. Das vom Objekt kommende Licht – beispielsweise Fluoreszenzlicht –, das von den Mikroskopobjektiven aufgesammelt wird, durchläuft nun die Beleuchtungsstrahlengänge in entgegengesetzter Richtung. An dem das Beleuchtungslicht aufteilende Bauteil wird nun das vom Objekt kommende Licht vereinigt und teilweise dem Detektor zugeführt.

[0003] Bei dem den Beleuchtungsstrahlengang aufteilenden bzw. den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil handelt es sich üblicherweise um Strahlteiler, die beispielsweise in Form gekitteter Strahlteilerwürfel verwendet werden. Bei diesen Bauteilen wird das einfallende Licht zu gleichen Teilen in einen in Geradeausrichtung transmittierten und einen im Winkel von 90 Grad abgelenkten Strahl aufgeteilt. Bei dem vom Objekt kommenden, an dem Strahlteilerwürfel zu vereinigenden Detektionslicht wird das Licht eines jeden Teilstrahlengangs in einen transmittierten und einen abgelenkten Teilstrahl aufgespalten, so dass von jedem Detektionslichtstrahl nur jeweils die Hälfte zum Detektor gelangt. Die andere Hälfte des vom Objekt kommenden Lichts kann nicht mit dem Detektor nachgewiesen werden und geht daher ungenutzt verloren.

[0004] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine optische Anordnung der gattungsbildenden Art derart auszustalten und weiterzubilden, dass das vom Objekt kommende Licht zumindest weitgehend verlustfrei an dem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil vereinigt und in eine Ausbreitungsrichtung geleitet werden kann.

[0005] Das erfundungsgemäße Verfahren der gattungsbildenden Art löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1. Danach ist eine solche optische Anordnung dadurch gekennzeichnet, dass das vom Objekt kommende Licht an dem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil bezüglich des für den Detektor wirksamen Strahlquerschnitts zumindest weitgehend überlappend in eine Ausbreitungsrichtung vereinigbar ist, wobei Mittel zur Beeinflussung der Phase des vom Objekt kommenden Lichts vorgesehen sind, die zumindest in einem Teilstrahlengang des Detektionsstrahlengangs angeordnet sind.

[0006] Erfundungsgemäß ist zunächst erkannt worden, dass nahezu das gesamte vom Objekt kommende Detektionslicht an dem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil vereinigt und in eine Ausbreitungsrichtung geleitet werden kann, wenn das Detektionslicht an der strahlvereinigenden Grenzschicht mit einer definierten Phasenbeziehung, beispielsweise phasengleich, ankommt. Hierzu sind

zum einen die zu vereinigenden Detektionsstrahlengänge bezüglich ihrer optischen Länge entsprechend abzustimmen, beispielsweise durch gleichlange optische Wege. Weiterhin sind Mittel zur Beeinflussung der Phase des Detektionslichts vorgesehen, die zumindest in einem Teilstrahlengang angeordnet sind und Phasenunterschiede der Detektionsteilstrahlengänge auszugleichen vermögen. Wenn nun das vom Objekt kommende Detektionslicht aus den einzelnen Teilstrahlengängen an dem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil ankommt und die Phasenbeziehung der beiden Detektionsteilstrahlen entsprechend eingestellt ist, interferiert das die beiden Teilstrahlengänge durchlaufende Detektionslicht konstruktiv an dem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil. In vorteilhafter Weise breitet sich bei konstruktiver Interferenz das Detektionslicht lediglich in eine Richtung aus, nämlich in Richtung des Detektors. In die andere Richtung breitet sich entsprechend kein Licht aus, da für diese Ausbreitungsrichtung destruktive Interferenz vorliegt.

[0007] Die Vereinigung des die einzelnen Teilstrahlengänge durchlaufenden Lichts erfolgt hierbei üblicherweise an einem Bereich der Grenzschicht des den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteils, der von beiden Teilstrahlengängen gleichermaßen oder zumindest weitgehend überlappend mit Detektionslicht beaufschlagt wird. Dieser Grenzschichtbereich ist im Allgemeinen auch die für die Detektion bzw. für den Detektor wirksame Fläche, die hier in diesem Zusammenhang als wirksamer Strahlquerschnitt bezeichnet wird, der nicht notwendigerweise orthogonal zur optischen Achse orientiert sein muss.

[0008] Üblicherweise wird als das den Detektionsstrahlengang vereinigende Bauteil ein Basissubstrat verwendet, das an mindestens einer Seite metallisch, dielektrisch oder metallisch-dielektrisch beschichtet ist. Auch entsprechende Strahlteilerwürfel mit metallischer, dielektrischer oder metallisch-dielektrischer Hybridenbeschichtung werden eingesetzt. Eine wichtige Rolle bei der konstruktiven bzw. destruktiven Interferenz an dem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil spielt der Phasensprung, der bei einer Reflexion an einem Übergang zu einem optisch dichteren Medium 180 Grad beträgt, während der Phasensprung bei einer Reflexion an einem Übergang zu einem optisch dünneren Medium 0 Grad beträgt, d. h. kein Phasensprung auftritt.

[0009] Zur optimalen Strahlvereinigung in eine Ausbreitungsrichtung ist mindestens ein Bauteil, beispielsweise das den Detektionsstrahlengang vereinigende Bauteil, derart ausgestaltet und/oder im Strahlengang angeordnet, dass es einen entsprechenden Reflexions- und/oder Transmissionsgrad aufweist. Zum einen kann das durch eine entsprechende Beschichtung des Bauteils erzielt werden, eine Anordnung bzw. Ausrichtung des Bauteils unter Berücksichtigung der Fresnell'schen Gleichungen ist hierzu ebenfalls vorgesehen.

[0010] Eine zumindest weitgehend verlustfreie Vereinigung des vom Objekt kommenden Lichts in eine Ausbreitungsrichtung wird auch dadurch begünstigt, dass mindestens ein Bauteil derart im Strahlengang angeordnet ist, dass das auf dieses Bauteil auftreffende Licht einen entsprechenden Einfallswinkel aufweist. Hierzu ist im Fall eines Strahlteilers als das den Detektionsstrahlengang vereinigende Bauteil in erster Linie das Snellius'sche Brechungsgesetz einschlägig.

[0011] Zur zumindest weitgehend verlustfreien Vereinigung des vom Objekt kommenden Lichts in eine Ausbreitungsrichtung ist mindestens ein Bauteil derart ausgestaltet und/oder im Strahlengang angeordnet, dass hierdurch ein entsprechender Phasenabgleich erzielbar ist. Hierbei könnte es sich beispielsweise um einen Spiegel handeln, der über

die einer Wellenlänge des Detektionslichts entsprechenden Strecke nanometergenau verstellt werden kann. Hierdurch ist ein entsprechender Phasenabgleich des Detektionsteilstrahlengangs, in dem dieser Spiegel angeordnet ist, bezüglich des anderen Detektionsteilstrahlengangs möglich.

[0012] Ganz allgemein kann das Bauteil das den Detektionsstrahlengang vereinigende Bauteil sein. Es wäre hierzu entsprechend zu beschichten, so dass der Reflexions- und Transmissionsgrad bei vorgegebenen Einfallwinkel geeignet zu wählen ist. Ein Phasenabgleich könnte ebenfalls mit dem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil durch entsprechende nanometergenaue Verstellung erzielt werden.

[0013] Bei dem Bauteil könnte es sich um ein metallisch oder dielektrisch beschichtetes Bauteil und/oder um ein Bauteil handeln, dass mit einer dielektrischen oder metallisch-dielektrischen Hybridbeschichtung versehen ist. Insbesondere bei dem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil könnte es sich um ein mit einer metallisch-dielektrischen Hybridbeschichtung versehenes Bauteil handeln.

[0014] In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Strahlteileranordnungen derart ausgestaltet und/oder im Strahlengang angeordnet sind, dass das Teilungs- und/oder Vereinigungsverhältnis für s- und p-polarisiertes Licht nahezu gleich ist. Dies ist insbesondere dann von großer Bedeutung, wenn das zu vereinigende Licht Fluoreszenzlicht beliebiger Polarisationsrichtung ist, da bei nahezu gleichem Vereinigungsverhältnis für s- und p-polarisiertes Licht die angestrebte Interferenz des Fluoreszenzlichts sehr effizient erfolgt, wodurch diese Vereinigung des vom Objekt kommenden Lichts nahezu verlustfrei in eine Ausbreitungsrichtung erfolgen kann.

[0015] Eine Grundbedingung zur konstruktiven Interferenz des zu vereinigenden Detektionslichts ist zumindest dann weitgehend erfüllt, wenn das die beiden Teilstrahlengänge durchlaufende, vom Objekt kommende Licht an der Grenzschicht des den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteils eine definierte Phasenbeziehung aufweist. Diese definierte Phasenbeziehung ist in erster Linie von den Eigenschaften der Grenzschicht des den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteils abhängig, so dass im Konkreten vorgesehen ist, die notwendige, definierte Phasenbeziehung einzustellen. Hierzu könnte die optische Weglänge mindestens eines der Teilstrahlengänge veränderbar sein. Eine solche Variation der optischen Weglänge könnte mit einer bereits erwähnten Verstellung eines in einem Teilstrahlengang angeordneten Spiegels erfolgen. Eine weitergehende bzw. feinere Einstellung der Phasenanpassung mit anderen Mitteln bzw. anderen im Strahlengang angeordneten Bauteilen ist ebenfalls vorgesehen.

[0016] Von den Eigenschaften der Grenzschicht des den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteils hängt es ab, ob das den einen Teilstrahlengang durchlaufende, vom Objekt kommende Licht bei seiner Transmission oder Reflexion eine Veränderung der Phase erfährt oder nicht. So könnte beispielsweise der reflektierte Anteil gegenüber dem transmierten Anteil des vom Objekt kommenden Lichts einen Phasensprung von 180 Grad erfahren. Die Phase des den anderen Teilstrahlengang durchlaufenden, vom Objekt kommenden Lichts könnte keine Phasenveränderung erfahren, so dass zum Erzielen der weitgehend verlustfreien Vereinigung des vom Objekt kommenden Lichts eine ganz bestimmte, definierte Phasenbeziehung eingestellt werden muss. Diese Einstellung könnte beispielsweise derart erfolgen, dass das die beiden Teilstrahlengänge durchlaufende, vom Objekt kommende Licht an der Grenzschicht des den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteils eine Pha-

senbeziehung aufweist, die zumindest weitgehend phasengleich oder gegenphasig ist.

[0017] In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass zur Phasenbeeinflussung des die Teilstrahlengänge durchlaufenden, vom Objekt kommenden Lichts die Variation der optischen Weglänge mindestens eines Teilstrahlengangs vorgesehen ist.

[0018] Als Mittel zur Beeinflussung der Phase des vom Objekt kommenden Lichts ist in einer bevorzugten Ausführungsform ein Doppelglaskeil vorgesehen. Dieser Doppelglaskeil besteht aus zwei gegeneinander verschiebbar angeordneten Glaskeilen, deren einander zugewandten Grenzflächen mit einem Immersionsmedium, beispielsweise Öl, geeignetem Brechungsindex und geeigneter Dispersion gefüllt ist. Der in einem kollimiert verlaufenden Teilstrahlengang angeordnete Doppelglaskeil wird von dem kollimiert verlaufenden Licht senkrecht durchtreten, d. h. die Grenzschicht Luft-Glas jedes Glaskeils ist orthogonal zu dem kollimiert verlaufenden Lichtstrahl angeordnet. Wenn die beiden Glaskeile quer zur Strahlrichtung gegeneinander bewegt werden, ändert sich hierdurch die optische Weglänge durch den Doppelglaskeil, da die Luft-Glas-Grenzflächen einen kleinen Keilwinkel zu den Glas-Immersionssmediums-Grenzflächen aufweisen. Durch die Variation der optischen Weglänge des Teilstrahlengangs, in dem der Doppelglaskeil angeordnet ist, kann die Phasenbeziehung des diesen Teilstrahlengang durchlaufenden Lichts relativ zu dem Licht des anderen Teilstrahlengangs beeinflusst bzw. variiert werden.

[0019] In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass das nach dem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil in unterschiedliche Richtungen verlaufende, vom Objekt kommende Licht jeweils mit mindestens einem Detektor detektierbar ist. Hierbei ist vorgesehen, dass mit einem Detektor das zumindest weitgehend in eine Ausbreitungsrichtung vereinigte, vom Objekt kommende Licht detektiert wird. Das in eine andere Richtung verlaufende, vom Objekt kommende Licht wird mit einem weiteren Detektor detektiert. Da die Intensität bzw. Leistung dieses Detektionslichts bei einer optimalen erfundungsgemäßen Strahlvereinigung nahezu 0 sein sollte, kann das Signal dieses Detektors zur Regelung der Phasenbeziehung der beiden Detektionsteilstrahlengänge genutzt werden. Weiterhin könnten sämtliche Detektionssignale der Detektoren zur Objektauswertung gemeinsam genutzt werden. Diese Vorgehensweise ermöglicht selbst bei nicht optimaler Detektionslichtvereinigung eine Optimierung der Detektionslichtausbeute.

[0020] In einer bevorzugten Ausführungsform ist jedem Detektor eine Detektionslochblende vorgeordnet. Somit handelt es sich bei einem entsprechenden Mikroskopaufbau um ein konfokales bzw. doppelkonfokales Rastermikroskop. Die Detektionslochblende korrespondiert hierbei optisch zu dem Beleuchtungsfokus des Mikroskopobjektivs, der seinerseits zu einer Anregungslochblende optisch korrespondiert.

[0021] Falls eine Detektion von mit Mehrphotonen-Anregungsprozessen angeregtem Fluoreszenzlicht vorgesehen ist, ist den Detektoren keine Detektionslochblende vorgeordnet. Das es sich bei Mehrphotonen-Anregungsprozessen um nichtlineare Prozesse handelt, ist beispielsweise die Wahrscheinlichkeit eines Zweiphotonen-Anregungsprozesses proportional zum Quadrat der Beleuchtungsintensität. In einem durch ein Mikroskopobjektiv fokussierten Lichtstrahl ist die Beleuchtungsintensität im Fokus des Mikroskopobjektivs am höchsten, wodurch bei ausreichender Beleuchtungsintensität hauptsächlich im Beleuchtungsfokus Mehrphotonen-Anregungsprozesse induziert werden können. Bei einer konfokalen bzw. fokussierten Beleuchtung in Verbindung mit einer Mehrphotonen-Anregung von Fluoreszenz-

farbstoffen kann daher das Fluoreszenzlicht mit großer Wahrscheinlichkeit nur aus aus dem Fokusbereich des Mikroskopobjektivs stammen, so dass das Einfügen einer Detektionslochblende zum Ausblenden der Bereiche außerhalb des Fokusbereichs des Mikroskopobjektivs nicht erforderlich ist.

[0022] Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszustalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die dem Patentanspruch 1 nachgeordneten Patentansprüche und andererseits auf die nachfolgende Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigen

[0023] Fig. 1 eine schematische Darstellung eines doppelkonfokalen Rastermikroskops,

[0024] Fig. 2 eine schematische Darstellung eines ersten Ausführungsbeispiels eines erfindungsgemäßen doppelkonfokalen Rastermikroskops,

[0025] Fig. 3 eine schematische Darstellung der Transmissions- bzw. Reflexionsverhältnisse bei dem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil und

[0026] Fig. 4 eine schematische Darstellung der Transmissions- und Reflexionsverhältnisse des spiegelverkehrts angeordneten Bauteils aus Fig. 3.

[0027] Fig. 1 zeigt eine optische Anordnung zum Beleuchten von Objekten 1 in Verbindung mit einem doppelkonfokalen Rastermikroskop. Die optische Anordnung umfasst einen Beleuchtungsstrahlengang 2 einer Lichtquelle 3, einen Detektionsstrahlengang 4 eines Detektors 5 und einen Detektionsstrahlengang 4 vereinigendes Bauteil 6.

[0028] Das zur Beleuchtung des Objekts 1 dienende Beleuchtungslight 27 der Lichtquelle 3 wird über eine Linse 7 auf die Anregungslochblende 8 abgebildet. Das die Anregungslochblende 8 passierende Licht wird von dem dichroitischen Strahleiter 9 in Richtung einer Strahlablenkvorrichtung 10 reflektiert. Die Strahlablenkvorrichtung 10 scannt den Beleuchtungslightstrahl 27 in zwei im Wesentlichen senkrecht zueinander stehenden Richtungen. Der von der Strahlablenkvorrichtung 10 reflektierte und gescannte Lichtstrahl trifft auf das Bauteil 6, wo es in zwei Teilstrahlen 11, 12 aufgeteilt wird. Das die beiden Teilstrahlen durchlaufende Beleuchtungslight wird an den Spiegeln 13, 14 reflektiert und über die Mikroskopobjektive 15, 16 von beiden Seiten aus in den gleichen Objektpunkt des Objekts 1 fokussiert. Das Ablenken des Beleuchtungslightstrahls 27 von der Strahlablenkvorrichtung 10 bewirkt eine Ortsänderung der Beleuchtungsfokus der beiden Mikroskopobjektive 15, 16, so dass das Objekt 1 zweidimensional in der Fokalebene beleuchtet werden kann.

[0029] Das lediglich schematisch gezeichnete Objekt 1 ist mit Fluoreszenzmarkern spezifisch markiert. Das durch das Beleuchtungslight 27 induzierte Fluoreszenzlicht, dass von den beiden Mikroskopobjektiven 15, 16 aufgesammelt wird, durchläuft den Beleuchtungsstrahlengang 2 in umgekehrter Richtung. Das vom Mikroskopobjektiv 15 aufgesammelte Fluoreszenzlicht wird vom Spiegel 13 in Richtung des den Detektionsstrahlengang 4 vereinigenden Bauteils 6 reflektiert. Ein Teil dieses Fluoreszenzlichts passiert das Bauteil 6 unabgelenkt, das als Lichtstrahl 17 aus dem Bauteil 6 austritt. Der andere Teil des den Teilstrahlengang 11 durchlaufenden Fluoreszenzlichts wird am Bauteil 6 in Richtung der Strahlablenkvorrichtung 10 reflektiert, so dass dieses Fluoreszenzlicht letztendlich von dem Detektor 5 detektiert werden kann. Das vom Mikroskopobjektiv 16 aufgesam-

melte Fluoreszenzlicht wird vom Spiegel 14 in Richtung des Bauteils 6 reflektiert. Ca. 50 Prozent des den Teilstrahlengang 12 durchlaufenden Fluoreszenzlichts wird am Bauteil 6 in Richtung 22 aus dem Detektionsstrahlengang 4 herausreflektiert. Das restliche Fluoreszenzlicht passiert das Bauteil 6 und wird über die Strahlablenkvorrichtung 10, den dichroitischen Strahleiter 9 in Richtung der Detektionslochblende 18 geleitet. Lediglich wenn Fluoreszenzlicht aus dem Beleuchtungsfokus der beiden Mikroskopobjektive 15, 16 stammt, kann dieses Fluoreszenzlicht die Detektionslochblende 18 passieren, da die Detektionslochblende 18 gemäß dem konfokalen Prinzip in einer zum Beleuchtungsfokus der beiden Mikroskopobjektive 15, 16 optisch korrespondierenden Ebene angeordnet ist. In gleicher Weise ist das Anregungspinhole 8 in einer optisch korrespondierenden Ebene zu dem gemeinsamen Beleuchtungsfokus der beiden Mikroskopobjektive 15, 16 angeordnet.

[0030] Das aus den Detektionsstrahlengang 4 austretende Fluoreszenzlicht 17 kann dem Detektor 5 nicht zugeführt werden. Demgemäß gehen bei der Detektion des vom Objekt 1 kommenden Fluoreszenzlichts ca. 50 Prozent verloren, da dieses verlorene Fluoreszenzlicht nicht von dem Detektor 5 nachgewiesen werden kann.

[0031] Erfindungsgemäß wird das vom Objekt 1 kommende Licht dem den Detektionsstrahlengang 4 vereinigenden Bauteil 6 zumindest weitgehend in eine Ausbreitungsrichtung 19 vereinigt, was Fig. 2 entnehmbar ist. Hierbei sind Mittel 20 zur Beeinflussung der Phase des vom Objekt 1 kommenden Lichts vorgesehen, die in dem Teilstrahlengang 12 des Detektionsstrahlengangs 4 angeordnet sind.

[0032] Das Bauteil 6 der Fig. 2 ist zur zumindest weitgehend verlustfreien Vereinigung des vom Objekt 1 kommenden Lichts in eine Ausbreitungsrichtung 19 derart ausgestaltet und im Strahlengang 4 angeordnet, dass es einen entsprechenden Reflexions- und Transmissionsgrad aufweist. Für das Beleuchtungslight 27 weist das Bauteil 6 einen Transmissionsgrad von 0,5 auf, so dass das Beleuchtungslight in die beiden Teilstrahlengänge 11, 12 in gleicher Intensität aufgespalten werden kann. Hinsichtlich der zumindest weitgehend verlustfreien Vereinigung des vom Objekt 1 kommenden Fluoreszenzlichts der beiden Teilstrahlengänge 11, 12 ist das Bauteil 6 im Strahlengang 4 derart angeordnet, dass das die Teilstrahlengänge 11 und 12 durchlaufende Fluoreszenzlicht in die durch den Pfeil 19 angedeutete Ausbreitungsrichtung geleitet wird. Das Bauteil 6 weist hinsichtlich des Beleuchtungslights 2 sowie des vom Objekt 1 kommenden Fluoreszenzlichts einen Einfallswinkel von jeweils 45 Grad auf.

[0033] Die optischen Weglängen der Teilstrahlengänge 11, 12 sind derart aufeinander abgestimmt, dass das die Teilstrahlengänge 11, 12 durchlaufende, vom Objekt 1 kommende Licht zumindest weitgehend phasengleich an dem Bauteil 6 ankommt. Ein Feinabgleich der optischen Weglänge der beiden Teilstrahlengänge 11, 12 wird durch eine Positionsvariation des Spiegels 14 durchgeführt, indem der Spiegel 14 orthogonal zu seiner Oberfläche vom Piezoelement 28 verschoben werden kann.

[0034] Das Mittel 20 zur Beeinflussung der Phase des vom Objekt 1 kommenden Lichts ist in Form eines Doppelglaskeils realisiert. Der Doppelglaskeil 20 ist im Teilstrahlengang 12 angeordnet. Das im Teilstrahlengang 12 parallel verlaufende Licht durchtritt die Luft-Glas-Grenzflächen des Doppelglaskeils 20 orthogonal. Zwischen den beiden Doppelglaskeilen befindet sich Immersionsöl, das nahezu den gleichen Brechungsindex und die gleiche Dispersion aufweist, wie das Glas der beiden Glaskeile. Die beiden Glaskeile des Doppelglaskeils 20 können jeweils entlang der Richtung 21 gegeneinander verschoben werden, so dass

hierdurch die optische Weglänge des Doppelglaskeils verändert werden kann.

[0035] In Fig. 3 ist schematisch dargestellt, dass das die unterschiedlichen Teilstrahlengänge 11, 12 durchlaufende Fluoreszenzlicht an dem Bauteil 6 lediglich in einem Fall einen Phasensprung von 180 Grad erfährt. Die beiden Pfeile 19, 22 zeigen die Ausbreitungsrichtung zum Detektor 5 bzw. die Ausbreitungsrichtung des Teilstrahls 17 an. Das den Teilstrahlengang 12 durchlaufende Fluoreszenzlicht weist einen durch das Bauteil 6 transmittierten Anteil 23 und einen am Bauteil 6 reflektierten Anteil 24 auf. Das den Teilstrahlengang 11 durchlaufende Fluoreszenzlicht weist einen am Bauteil 6 in Richtung zum Detektor 5 reflektierten Anteil 25 und einen durch das Bauteil 6 transmittierten Anteil 26 in Richtung 22 auf. Lediglich der an dem Bauteil 6 reflektierte Anteil 24 des den Teilstrahlengang 12 durchlaufenden Fluoreszenzlichts weist ein Phasensprung von 180 Grad (π) auf. Die Anteile 23, 25, 26 weisen keinen Phasensprung auf. Fig. 4 zeigt die gleichen Anteile des vom Objekt 1 kommenden Fluoreszenzlichts 23, 24, 25, 26, die an dem Bauteil 6 reflektiert werden oder durch das Bauteil 6 hindurchtreten. Im Gegensatz zu Fig. 3 ist das Bauteil 6 derart angeordnet, dass seine dielektrische Hybridschicht den Anteilen 25, 26 zugeordnet sind, die den Teilstrahlengang 11 durchlaufen. Demgemäß weist lediglich der am Bauteil 6 reflektierte Anteil 25 einen Phasensprung von 180 Grad auf. In erfundungsgemäßer Weise ist mit dem Mittel 20 die Phasenbeziehung des die Teilstrahlengänge 11, 12 durchlaufenden Fluoreszenzlichts derart einzustellen, dass die durch das Bauteil 6 der Fig. 2 transmittierten Anteile 26 bzw. die am Bauteil 6 der Fig. 2 reflektierten Anteile 24 sich auslöschen.

[0036] Abschließend sei ganz besonders darauf hingewiesen, dass die voranstehend erörterten Ausführungsbeispiele lediglich zur Beschreibung der beanspruchten Lehre dienen, diese jedoch nicht auf die Ausführungsbeispiele einschränken.

Bezugszeichenliste

1 Objekt	40
2 Beleuchtungsstrahlengang	
3 Lichtquelle	
4 Detektionsstrahlengang	
5 Detektor	
6 das den (4) vereinigende Bauteil	45
7 Linse	
8 Anregungslochblende	
9 dichroitischer Strahleiter	
10 Strahlablenkvorrichtung	
11 Teilstrahl	50
12 Teilstrahl	
13 Spiegel	
14 Spiegel	
15 Mikroskopobjektiv	
16 Mikroskopobjektiv	55
17 aus (4) austretender Teilstrahl	
18 Detektionslochblende	
19 Ausbreitungsrichtung zu (5)	
20 Mittel zur Beeinflussung der Phase	
21 Bewegungsrichtung von (20)	60
22 Ausbreitungsrichtung von (17)	
23 an (6) transmittierter Anteil des (12) durchlaufenden Lichts	
24 an (6) reflektierter Anteil des (12) durchlaufenden Lichts	
25 an (6) reflektierter Anteil des (11) durchlaufenden Lichts	65
26 an (6) transmittierter Anteil des (11) durchlaufenden Lichts	
27 Beleuchtungslicht	

28 Piezoelement

Patentansprüche

1. Optische Anordnung zum Beleuchten von Objekten (1), insbesondere von Fluoreszenzobjekten, vorzugsweise in Verbindung mit einem konfokalen oder einem doppelkonfokalen Rastermikroskop, mit einem Beleuchtungsstrahlengang (2) einer Lichtquelle (3), einem Detektionsstrahlengang (4) eines Detektors (5) und einem den Detektionsstrahlengang (4) vereinigenden Bauteil (6), dadurch gekennzeichnet, dass das vom Objekt (1) kommende Licht an dem den Detektionsstrahlengang (4) vereinigenden Bauteil (6) bezüglich des für den Detektor wirksamen Strahlquerschnitts zumindest weitgehend überlappend in eine Ausbreitungsrichtung (19) vereinigbar ist, wobei Mittel (20) zur Beeinflussung der Phase des vom Objekt (1) kommenden Lichts vorgesehen sind, die zumindest in einem Teilstrahlengang (12) des Detektionsstrahlengangs (4) angeordnet sind.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Bauteil zur zumindest weitgehend verlustfreien Vereinigung des vom Objekt (1) kommenden Lichts in eine Ausbreitungsrichtung (19) derart ausgestaltet und/oder im Strahlengang (4) angeordnet ist, dass es einen entsprechenden Reflexions- und/oder Transmissionsgrad aufweist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Bauteil zur zumindest weitgehend verlustfreien Vereinigung des vom Objekt (1) kommenden Lichts in eine Ausbreitungsrichtung (19) derart im Strahlengang angeordnet ist, dass auf das Bauteil auftreffende Licht einen entsprechenden Einfallswinkel aufweist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Bauteil zur zumindest weitgehend verlustfreien Vereinigung des vom Objekt (1) kommenden Lichts in eine Ausbreitungsrichtung (19) derart ausgestaltet und/oder im Strahlengang angeordnet ist, dass hierdurch ein entsprechender Phasenabgleich erzielbar ist.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Bauteil das den Detektionsstrahlengang (4) vereinigende Bauteil (6) ist.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Bauteil ein metallisch oder dielektrisch beschichtetes Bauteil ist.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Bauteil (6) ein mit dielektrischer oder metallisch-dielektrischer Hybridschicht versehenes Bauteil ist.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahleiteranordnungen derart ausgestaltet und/oder im Strahlengang angeordnet sind, dass das Teilungs- und/oder Vereinigungsverhältnis für s- und p-polarisiertes Licht nahezu gleich ist.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das die beiden Teilstrahlengänge (11, 12) durchlaufende, vom Objekt (1) kommende Licht an der Grenzschicht des den Detektionsstrahlengang (4) vereinigenden Bauteils (6) eine definierte Phasenbeziehung aufweist.
10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das die beiden Teilstrahlengänge (11, 12) durchlaufende, vom Objekt (1) kommende Licht an der Grenzschicht des den Detektionsstrahlengang (4) ver-

einigenden Bauteils (6) eine Phasenbeziehung aufweist, die zumindest weitgehend phasengleich oder gegenphasig ist.

11. Vorrichtung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die definierte Phasenbeziehung auf die Eigenschaften der Grenzschicht des den Detektionsstrahlengang (4) vereinigenden Bauteils (6) einstellbar ist. 5

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass zur Einstellung einer definierten Phasen- 10 beziehung die optische Weglänge mindestens eines der Teilstrahlengänge (11, 12) veränderbar ist.

13. Vorrichtung nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Position mindestens eines 15 Spiegels (14) variierbar ist.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass als Mittel (20) zur Beeinflussung der Phase des vom Objekt (1) kommenden Lichts ein Doppelglaskeil vorgesehen ist.

15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekenn- 20 zeichnet, dass die optische Weglänge durch den Doppelglaskeil varierbar ist.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass das nach dem den Detektionsstrahlengang (4) vereinigenden Bauteil (6) in 25 unterschiedliche Richtungen (19, 22) verlaufende, vom Objekt (1) kommende Licht jeweils mit mindestens einem Detektor (5) detektierbar ist.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekenn- 30 zeichnet, dass die Detektionssignale der Detektoren zur Objektauswertung gemeinsam nutzbar sind.

18. Vorrichtung nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass jedem Detektor (5) eine Detektionslochblende (18) vorgeordnet ist.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, 35 dadurch gekennzeichnet, dass den Detektoren bei der Detektion von mit Mehrphotonen-Anregungsprozessen angeregtem Fluoreszenzlicht keine Detektionslochblende vorgeordnet ist.

40

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

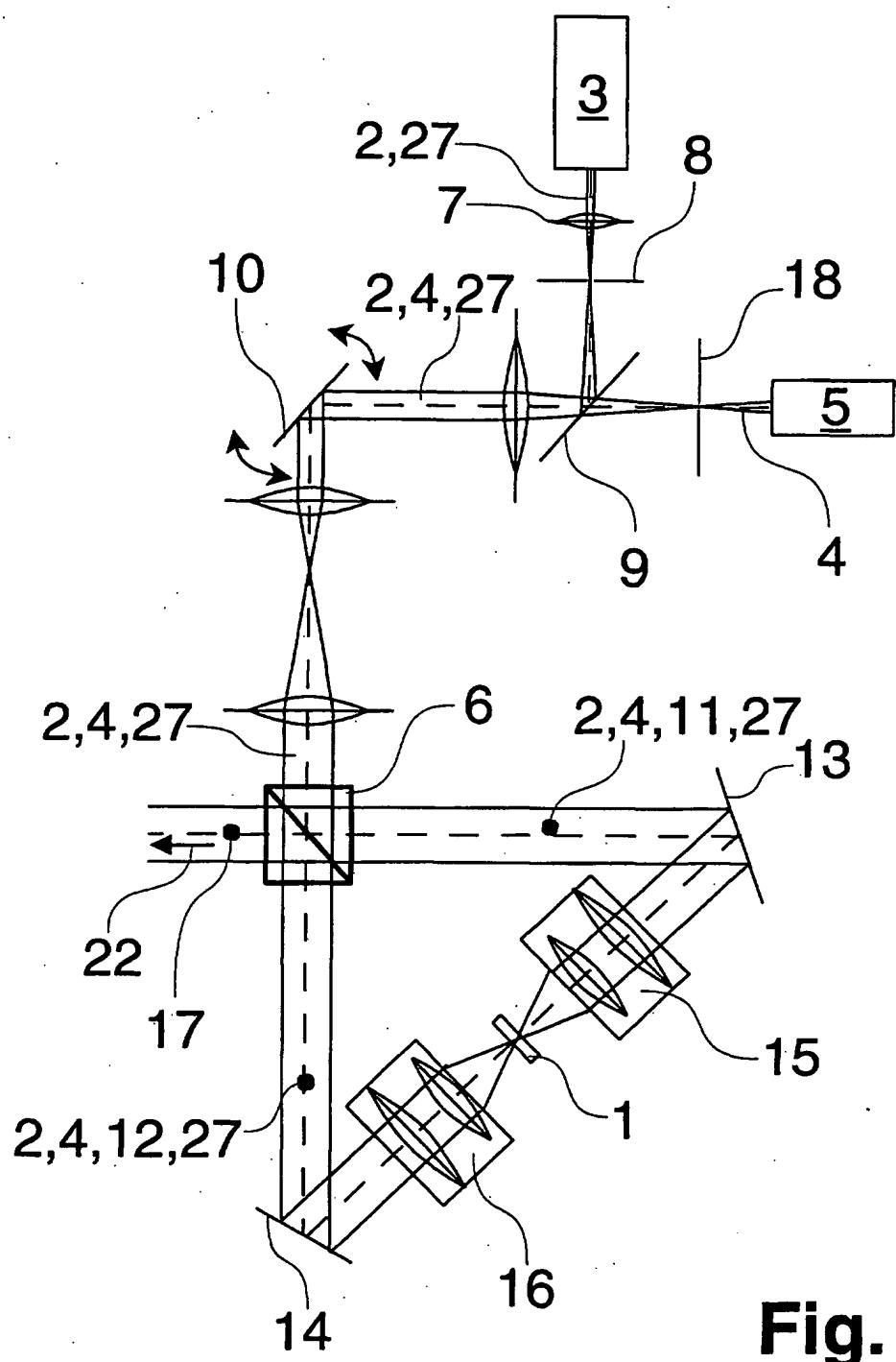
45

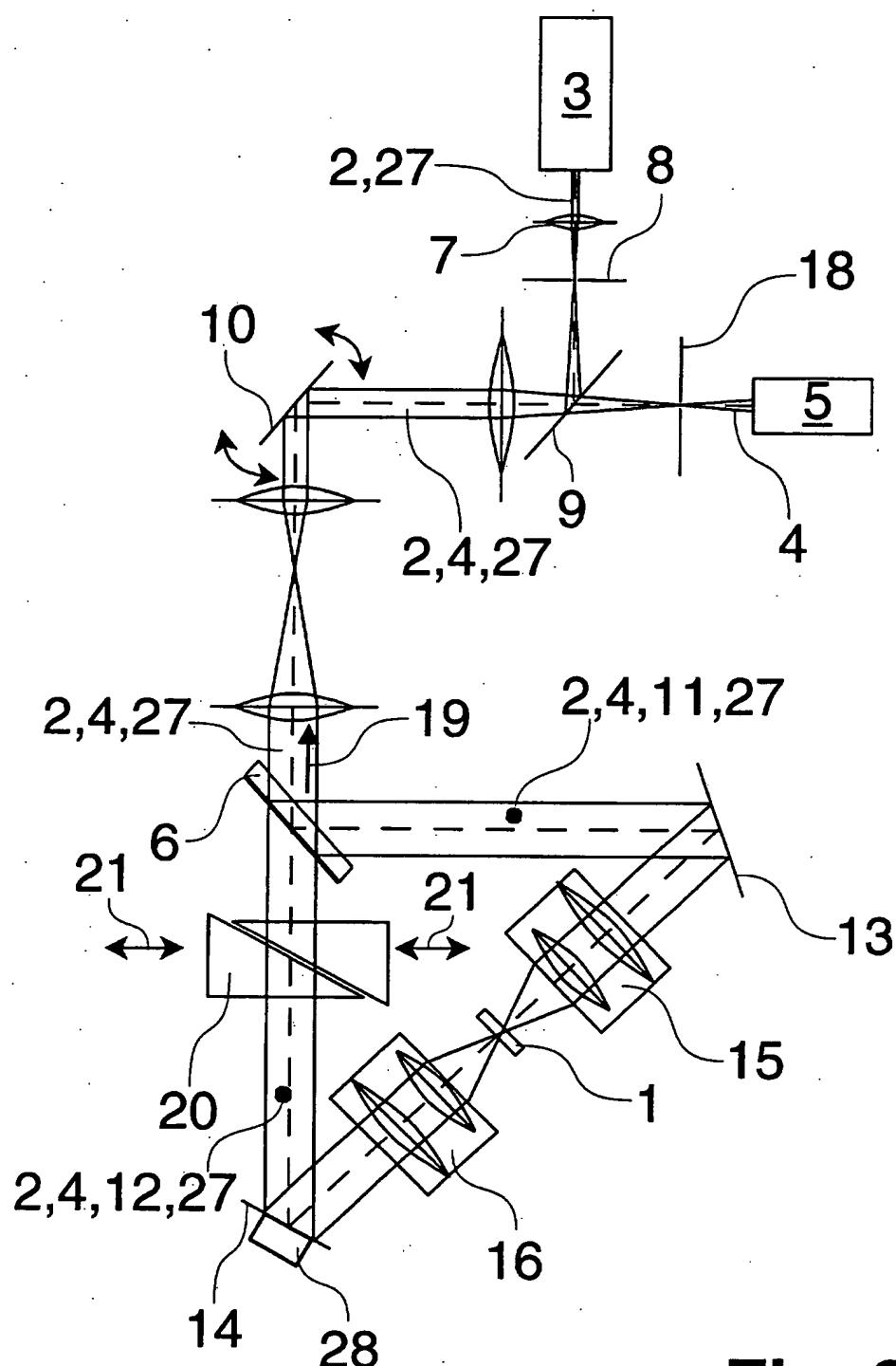
50

55

60

65

**Fig. 1**

**Fig. 2**

Zum Detektor

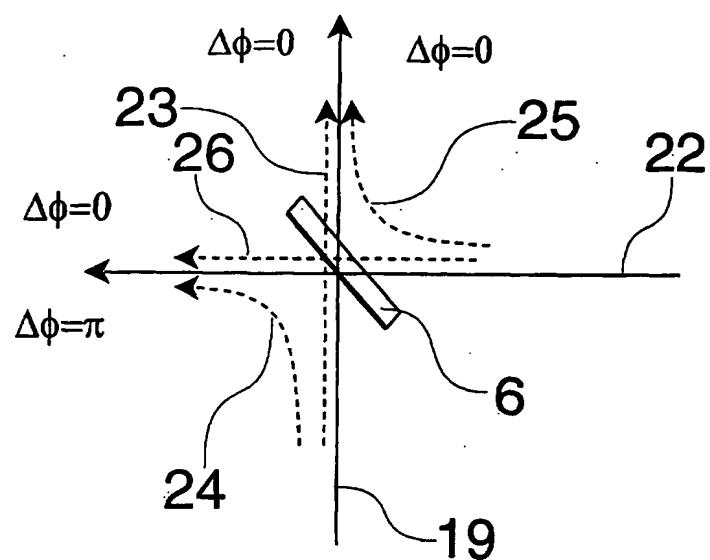


Fig. 3

Zum Detektor

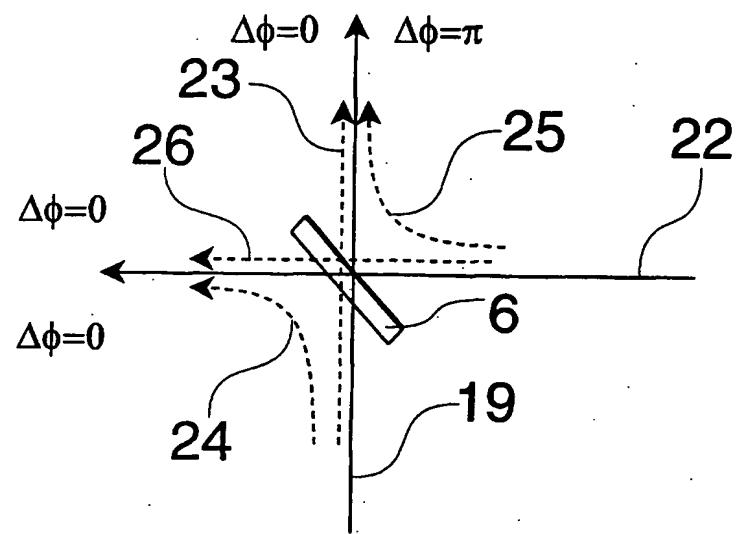


Fig. 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.